

# 三次元培養骨芽細胞の細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 動態観察と力学刺激応答

杉浦直樹<sup>1</sup>・田中茂雄<sup>2</sup>

<sup>1</sup>〒920-1192 金沢市角間町 金沢大学自然科学研究科

<sup>2</sup>〒920-1192 金沢市角間町 金沢大学環日本海域環境研究センター

Naoki Sugiura<sup>1</sup> and Shigeo Tanaka<sup>2</sup>:

Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  response of 3D-cultured osteoblasts to mechanical stimulation

## 1. 緒言

細胞は外部からの刺激情報を受け取った後、細胞内のさまざまな情報伝達物質の反応により伝達され、必要な細胞応答を引き起こす。その情報伝達物質の中でも、刺激後初期の段階で細胞内へ伝達するセカンドメッセンジャーとしてカルシウムイオン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) が知られており、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の挙動を観察することは刺激感知機構や伝達機構を解明する上で重要である。これまでの骨の細胞に対する細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  応答観察では、二次元培養された細胞に力学刺激として液体流動を負荷し、その際の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  応答を蛍光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡により観察してきた<sup>1)</sup>。それに対し、実際の骨組織内では荷重負荷で生じた組織の変形 (ひずみ) により骨小腔や骨小管内に骨液の流動が生じ、これが骨の細胞を力学的に刺激していると考えられている (ひずみ誘導型液体流動)。このような基質の変形が伴う三次元的な力学的環境では、焦点位置のずれやそれに伴う蛍光強度の変化が生じるため、骨の細胞の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  応答を顕微鏡により観察することは困難である。そこで我々はこれまでに、発光ダイオード (LED) とフォトダイオード (PD) といった小型光学素子を利用し、基質変形を伴う力学刺激に対して細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  応答をマクロレベルで観察できるシステムを構築してきた<sup>2)</sup>。本研究では、同システムを用いて基質変形を伴う力学刺激に対する骨芽細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  応答の負荷周波数依存性を調べることを目的とした。

## 2. 実験方法

### 2. 1 三次元培養骨芽細胞

$16 \times 10^6$  個のマウス頭蓋冠由来の樹立系骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) を I 型コラーゲンスポンジ担体 (W 20 mm × L 16 mm × t 2 mm、孔径: 約 100  $\mu\text{m}$ ) に播種することで三次元培養した (図 1)。使用した培地は、10% 牛胎児血清と 1% 抗生物質を含む  $\alpha$ -MEM である。細胞播種 12 時間後、濃度が 3  $\mu\text{M}$  となるように  $\text{Ca}^{2+}$  感受性蛍光プローブを培地に添加し、さらに 1 時間インキュベートした後実験に用いた。なお本研究では  $\text{Ca}^{2+}$  感受性蛍光プローブとして Fluo4-AM (励起波長: 490 nm、蛍光波長: 518 nm) を使用した。

### 2. 2 細胞への力学刺激

本研究では、バイモルフ型ピエゾアクチュエータ<sup>3)</sup>を駆動させることで再生骨に対して最大 0.2% の繰り返し圧縮負荷を 0.2 Hz、2 Hz、20 Hz で 150 秒間与えた。細胞はスポンジの変形により生じるひずみ誘導型液体流動により刺激される (図 2)。圧縮負荷により生じるスポンジの変位はうず電流型非接触変位計を用いてモニタリングした。

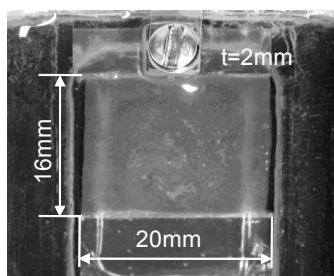


図 1 I 型コラーゲンスポンジと MC3T3-E1 細胞から構成される再生骨

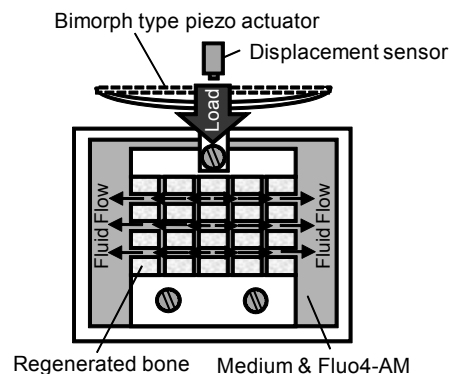


図 2 細胞へのひずみ誘導型液体流動の負荷

### 2. 3 細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 動態観察

図 3 は本研究で構築した細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態観察システムである。本システムは  $\text{Ca}^{2+}$  感受性蛍光プローブの励起光源である 4 つの LED (波長 : 490 nm) と、その中央に配置された蛍光検出用の PD から構成され、培養チャンバー直下に設置される。LED 光により細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  と結合した Fluo4 を励起し、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度に依存した強度の蛍光を PD により検出する。なお、PD で蛍光のみ検出するために、LED 上と PD 上に光学フィルターを設けた。また、LED からの励起光は凸レンズにより再生骨中央部の直径約 5 mm の領域に集光され、この領域における平均的な細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  応答が観察される。LED の発光強度と発光時間の制御、PD からの検出信号の取得および力学刺激負荷装置の制御は、Visual Basic で記述したプログラムにより 16 bit の分解能を持つ AD/DA インターフェイス・ボードを操作することで行った。なお細胞応答の評価パラメータとして、検出信号から刺激時間に対する応答時間割合および応答振幅の時間積算値を求めた。

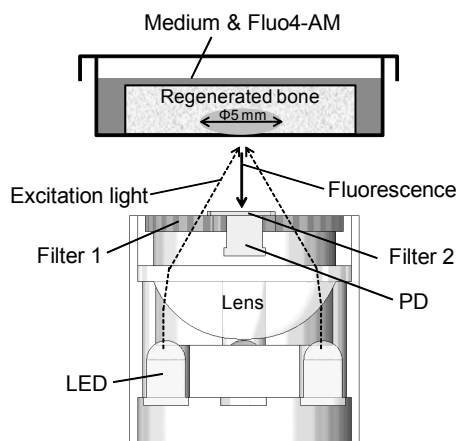


図 3 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動態観察システム

### 3. 実験結果

図 4 は力学刺激を受けた際の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  応答の代表例である。骨芽細胞は 20 Hz の刺激に対し最も大きな反応を示した。各負荷周波数における細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  応答の違いを図 5 に示す。刺激時間に対する細胞の応答時間割合は、0.2 Hz で 19.5 %、2 Hz で 38.0 %、20 Hz で 73.5 %であった (図 5 a)。また刺激時間に対する細胞の応答振幅の時間積算値は、0.2 Hz で 3.4 mV、2 Hz で 8.9 mV、20 Hz で 23.2 mV であった (図 5 b)。以上より、負荷する刺激の周波数が増加すると、細胞の応答が高まることが確認できた。

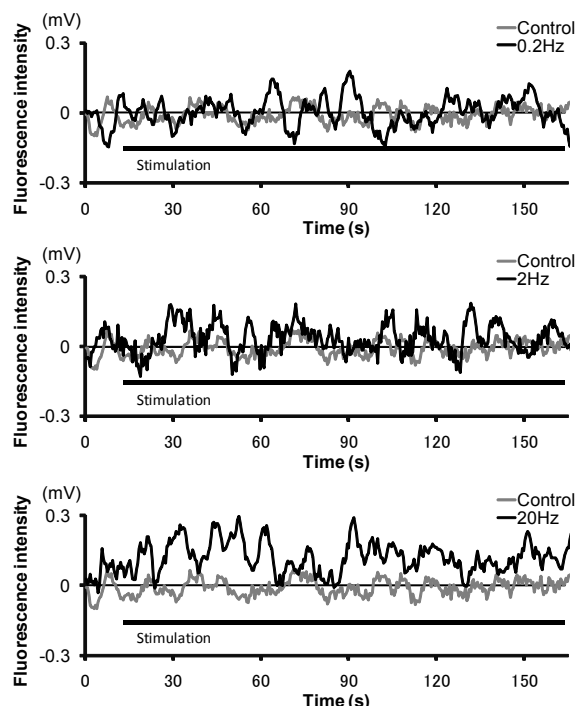


図4 各負荷周波数における細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  応答  
(a) 0.2Hz、(b) 2Hz、(c) 20Hz

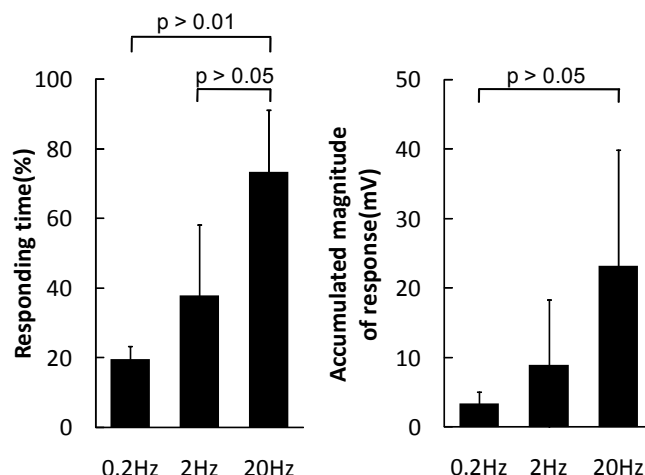


図5 負荷周波数の違いによる細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  応答の比較 (n = 4~5)

#### 4. 考察

以上の結果より骨芽細胞の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  応答は力学刺激の周波数に依存することが示された。これは周波数の増加に伴い、スポンジ担体内の培地の流動により生じるせん断応力が増加したことが要因であると考えられる。本実験で生じたせん断応力は、0.2 Hz で約 0.04 Pa、2 Hz で約 0.4 Pa、20 Hz で約 4 Pa であると推測される<sup>4)</sup>。実験動物を用いた研究においても、力学刺激に対する骨形成反応には周波数依存性があることが報告されており<sup>5)</sup>、本研究で得られた結果と一致している。今後、より高い周波数での力学刺激における細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  応答を調べるとともに、本研究で観察された細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  応答の周波数依存性が石灰化過程においても同様であるかどうかを確認する必要がある。

#### 5. 結言

本研究では基質変形を伴う力学刺激に対する骨芽細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  応答の周波数依存性を 0.2 Hz ~ 20 Hz の範囲で調べた。その結果、三次元培養骨芽細胞は高い周波数の力学刺激に対し、より大きく反応することが示された。本研究で得られた知見は、実際の骨組織内の力学的環境下における骨の細胞の刺激応答性を理解する上で有用な情報になり得ると考えられる。

#### 参考文献

- 1) Donahue SW et al., Journal of Biomechanics, Vol.38, pp1909-1917, 2005
- 2) 杉浦ら、臨床バイオメカニクス、Vol. 30, pp41-46, 2009
- 3) Tanaka SM et al., Journal of Biomechanics, Vol.32, pp427-430, 1999
- 4) Tanaka SM et al., Calcified Tissue International, Vol.76, pp261-271, 2005
- 5) Rubin, CT et al., Clinical Orthopaedics and Related Research, Vol.298, pp165-174, 1994